

29.10.2004

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 3 年 1 0 月 9 日

REC'D 23 DEC 2004

WIPO

PCT

出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 3 5 1 3 8 8  
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 3 5 1 3 8 8]

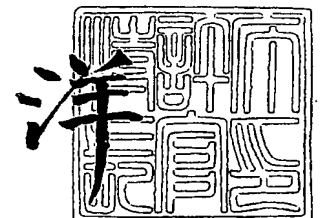
出 願 人  
Applicant(s): 中 外 製 薬 株 式 有 限 公 司

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 2 月 9 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



出 証 番 号 出 証 特 2 0 0 4 - 3 1 1 2 3 5 1

【書類名】 特許願  
【整理番号】 C1-A0315  
【提出日】 平成15年10月 9日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【発明者】  
    【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内  
    【氏名】 井川 智之  
【発明者】  
    【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内  
    【氏名】 関森 泰男  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000003311  
    【氏名又は名称】 中外製薬株式会社  
【代理人】  
    【識別番号】 100102978  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 清水 初志  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100108774  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 橋本 一憲  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 041092  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

高濃度の免疫グロブリンが安定化された溶液であって、免疫グロブリンがIgMである溶液。

**【請求項 2】**

IgMを1mg/mLより高濃度で含有する、請求項 1 に記載の溶液。

**【請求項 3】**

水性溶液である、請求項 1 に記載の溶液。

**【請求項 4】**

医薬品製剤である、請求項 1 に記載の溶液。

**【請求項 5】**

多価カチオン性イオンを含有する、請求項 1 に記載の溶液。

**【請求項 6】**

多価カチオン性イオンを1mM~1000mMの濃度で含有する、請求項 5 に記載の溶液。

**【請求項 7】**

多価カチオン性イオンが、Mgイオン又はArgイオンである、請求項 5 に記載の溶液。

**【請求項 8】**

さらに糖類を含有する、請求項 5 に記載の溶液。

**【請求項 9】**

pHが5~8である、請求項 1 に記載の溶液。

**【請求項 10】**

IgM以外のヒト由来の他のタンパク質を本質的に含有しない、請求項 1 に記載の溶液。

**【請求項 11】**

IgM以外のタンパク質を本質的に含有しない、請求項 1 に記載の溶液。

**【請求項 12】**

高濃度の免疫グロブリンを含有する溶液を安定化する方法であって、免疫グロブリンがIgMであり、溶液に多価カチオン性イオンを添加する方法。

**【請求項 13】**

溶液がIgMを1mg/mLより高濃度で含有する、請求項 12 に記載の方法。

**【請求項 14】**

溶液が水性溶液である、請求項 12 に記載の方法。

**【請求項 15】**

溶液が医薬品製剤である、請求項 12 に記載の方法。

**【請求項 16】**

多価カチオン性イオンを1mM~1000mMの濃度で含有するように、溶液に多価カチオン性イオンを添加する、請求項 12 に記載の方法。

**【請求項 17】**

多価カチオン性イオンが、Mgイオン又はArgイオンである、請求項 12 に記載の方法。

**【請求項 18】**

さらに糖類を添加する、請求項 12 に記載の方法。

**【請求項 19】**

溶液のpHが5~8である、請求項 12 に記載の方法。

**【請求項 20】**

溶液が、IgM以外のヒト由来の他のタンパク質を本質的に含有しない、請求項 12 に記載の方法。

**【請求項 21】**

溶液が、IgM以外のタンパク質を本質的に含有しない、請求項 12 に記載の方法。

**【請求項 22】**

高濃度の免疫グロブリンが安定化された溶液を製造する方法であって、免疫グロブリンがIgMであり、溶液に多価カチオン性イオンを添加する方法。

**【請求項 23】**

溶液がIgMを1mg/mLより高濃度で含有する、請求項 22 に記載の方法。

**【請求項 24】**

溶液が水性溶液である、請求項 22 に記載の方法。

**【請求項 25】**

溶液が医薬品製剤である、請求項 22 に記載の方法。

**【請求項 26】**

多価カチオン性イオンを1mM～1000mMの濃度で含有するように、溶液に多価カチオン性イオンを添加する、請求項 22 に記載の方法。

**【請求項 27】**

多価カチオン性イオンが、Mgイオン又はArgイオンである、請求項 22 に記載の方法。

**【請求項 28】**

さらに糖類を添加する、請求項 22 に記載の方法。

**【請求項 29】**

溶液のpHが5～8である、請求項 22 に記載の方法。

**【請求項 30】**

溶液が、IgM以外のヒト由来の他のタンパク質を本質的に含有しない、請求項 22 に記載の方法。

**【請求項 31】**

溶液が、IgM以外のタンパク質を本質的に含有しない、請求項 22 に記載の方法。

**【請求項 32】**

請求項 22 から 31 のいずれかの方法により製造された溶液。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】IgM高濃度安定化溶液

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、IgM高濃度安定化溶液およびその製造に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

多くの高等動物の免疫グロブリンには、5種類の異なったクラスIgG、IgA、IgM、IgD、およびIgEが存在する。各クラスの免疫グロブリンは、大きさ、電荷、アミノ酸組成、糖含量等の性状が異なっている。これらのクラスの中で、IgMは血漿免疫グロブリン全体の約10%を占めている。IgMは、複雑な抗原性を持つ細胞膜抗原、感染性微生物、あるいは溶解性抗原に対して産生される初期抗体の主成分である。

## 【0003】

ヒトIgMは、通常、5量体構造を有している。IgMの5量体構造を構成する5つのサブユニットは、IgGに類似した4本鎖構造からなっている。IgMのH鎖である $\mu$ 鎖はIgGのH鎖である $\gamma$ 鎖とアミノ酸配列が異なる以外にも次のような相違を有する。

- ・ $\mu$ 鎖は、定常領域のドメインを、 $\gamma$ 鎖よりも一つ余分に持っている。
- ・ $\mu$ 鎖は、オリゴ糖鎖の数が $\gamma$ 鎖と比較して4箇所多い。

## 【0004】

IgMは、IgGには見られないJ鎖と呼ばれるポリペプチド鎖を有する。J鎖は、IgMが抗体産生細胞から分泌される前に、 $\mu$ 鎖の会合を補助すると考えられている。

## 【0005】

近年、モノクローナル抗体技術および組換えDNA技術の発展により、純粋な免疫グロブリンを大量に生産することが可能になった。更に遺伝子組み換え技術は、キメラ抗体やヒト化抗体生産を可能にした。キメラ抗体とは、可変領域を異なる種に由来する可変領域に組み換えた構造を有する抗体である。たとえば、ヒト以外の動物種の可変領域とヒト抗体の定常領域を有する「キメラ抗体」(非特許文献1/Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, (1984) 81:6851)が公知である。更に、他の動物種の相補性決定領域(complementarity determining regions;CDR)をヒトイムノグロブリンに移植したヒト化抗体も公知である(非特許文献2/Nature (1986)321:521)。

## 【0006】

実際に、抗腫瘍抗体に関して列举すると、抗CD20ヒトキメラ抗体であるリツキサン(Rituxan:IDEC社)や抗HER2/neuヒト化抗体であるハーセプチン(Herceptin:Genentech社)が臨床試験を終了し、既に承認・販売されている。IgGおよびIgMのエフェクター機能として抗体依存性細胞障害活性(以下、ADCC活性と表記する)や補体依存性細胞障害活性(以下、CDC活性と表記する)が知られている。IgMのCDC活性はIgGと比較して高いことから、CDC活性を主薬効とする抗腫瘍抗体となる可能性が極めて高いと思われる。しかし上述のとおり、IgMはIgGと異なり多量体を形成する。そのため、組換え体IgMを工業的規模で生産することは困難であると考えられていた。

## 【0007】

また、IgMは、IgGに比べて極めて不安定であり、また溶解度が低いことから、IgMの高濃度且つ安定な溶液を作製することは困難である。例えば、Cytotherapy, 2001, 3(3), 233-242(非特許文献5)は、IgMの-20℃保存においても溶解時にIgMの沈殿および活性低下が起こったことを報告している。また、同文献には、IgMは保存時に会合化および沈殿を起こしやすいことが記載されている。特に、IgMについては、緩衝液種とpHの最適化のみでは、医薬品としての使用に耐えうる安定性を確保するのは困難であった。

## 【0008】

そこで、緩衝液種とpHの最適化以外で、抗体を安定化させる種々の試みがなされている。例えば、W02002/096457(特許文献1)においては、酸性成分を含有する抗体高濃度安定剤が開示され、抗体の安定化のためにMgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>を添加剤として使用している。し

かし、該公報における抗体安定化は、IgG製剤に関するものであって、IgMへの言及はない。上述したようにIgMはIgGと異なり多量体として存在し、本来的に安定なIgGとは異なり会合しやすいために高濃度化が極めて困難であるという特有の課題がある。

【0009】

また、Clin. Chem. Lab. Med. 2000; 38(8):759-764 (非特許文献3) および Journal of Immunological Methods, 111 (1988) 17-23 (非特許文献5) で、IgMは低塩濃度下で沈殿し、リン酸緩衝液あるいはトリス塩酸緩衝液の弱アルカリ性緩衝液かつ高塩濃度下で再溶解することが報告されている。(Clin. Chem. Lab. Med. 2000; 38(8):759-764 (非特許文献3) においては、pH 5付近ではIgMは沈殿しやすく取扱が困難なことが述べられ、弱酸性側の緩衝液においてIgM溶液に対しては悲観的であることが示唆されており、したがって、IgMの高濃度溶液を医薬品あるいはその原薬として提供できる可能性については何ら示されていない。また、本文献では、IgMを高濃度で含有するヒト血清を水で希釈するとeuglobulin沈殿として不溶性の凝集体が生じて濁度が上昇するが、NaCl、Arginine等の添加により塩濃度を上げるとeuglobulin沈殿が再溶解することが報告されている。しかし、本文献はeuglobulin沈殿の再溶解に関するものであり、IgMの水溶性会合体の増加抑制に関しては何ら開示されていない。さらに、本文献では患者血清を精製せずに用いており種々の血清タンパク質が存在するため、生じる不溶性の凝集体にはIgM以外のタンパク質が含まれる可能性があり、他のタンパク質非存在下でのIgM溶液に対する効果については示されていない。

【0010】

Journal of Immunological Methods, 111 (1988) 17-23 (非特許文献5) では、euglobulin沈殿の再溶解に0.1 M Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 8の緩衝液が用いられているが、IgMの回収率は抗体あるいはバッチによって40 % から >90 % の範囲であり再現性が低いと記述されている。また、方法の項で4℃および -20℃において5-10 mg/mLの精製抗体を保存したことが記述されているが、結果の項では-20℃において数ヶ月間、機能低下なく保存できたことのみ記述されており、通常、安定性の確保が困難な4℃あるいはそれ以上の保存温度については何ら記載されていない。したがって、本文献では、IgMの高濃度溶液を医薬品あるいはその原薬として提供するためには、沈殿再溶解の再現性の困難さと保存安定性の確保の困難さが示されている。

【0011】

また、BIOTECHNOLOGY 1993, 11, 512-515 (非特許文献4) および Journal of Immunological Methods, 111 (1988) 17-23 (非特許文献5) においても、euglobulin沈殿である抗体の不溶性凝集体の再溶解について記載されているが、その溶解度は10mg/mL以下であり、IgMの溶解度は低い。また、水溶性の会合体の安定化については何ら記載されていない。

【0012】

さらに、Pharmaceutical Research 1994, 11(5), 624-632 (非特許文献6) においては、PVP添加によるIgMの安定化が開示されているが、高濃度の抗体の安定化ではなく、また、Journal of Immunological Methods 1995, 181(1), 37-43. (非特許文献7) においては、トレハロース添加による凍結乾燥製剤が開示されているが、抗体の安定性不十分であり、高濃度の抗体の安定化に関する記載はない。

【特許文献1】 W02002/096457

【非特許文献1】 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., (1984) 81:6851

【非特許文献2】 Nature (1986) 321:521

【非特許文献3】 Clin. Chem. Lab. Med. 2000; 38(8):759-764

【非特許文献4】 BIOTECHNOLOGY 1993, 11, 512-515

【非特許文献5】 Journal of Immunological Methods, 111 (1988), 17-23

【非特許文献6】 Pharmaceutical Research 1994, 11(5), 624-632

【非特許文献7】 Journal of Immunological Methods 1995, 181, 37-43

【非特許文献8】 Cytotherapy, 2001, 3(3), 233-242

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0013】

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、高濃度のIgMを溶液中にて安定化させることにある。より詳しくは、本発明は、高濃度のIgMを安定化する方法、高濃度のIgMが安定化された溶液およびその製法を提供することを目的とする。

## 【0014】

高濃度のIgMが安定化された溶液の好ましい態様においては、水溶性の会合体増加が抑制されている水溶液を提供する。他の好ましい態様においては、医薬品としての使用に耐えうる安定性を有するIgM高濃度製剤を提供する。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0015】

本発明者は、上記課題を解決すべく鋭意研究を行なった結果、塩化マグネシウムや塩酸アルギニン等の多価カチオン性のイオンを含む化合物を添加物として用いることによって、溶液におけるIgMの会合化を抑制し、IgMの安定な高濃度溶液を調製しうることを見出した。

## 【0016】

即ち、本発明は、高濃度のIgMを安定化する方法、高濃度のIgMが安定化された溶液およびその製法に関し、より詳しくは、下記発明を提供するものである。

- (1) 高濃度の免疫グロブリンが安定化された溶液であって、免疫グロブリンがIgMである溶液。
- (2) IgMを1mg/mLより高濃度で含有する、(1)に記載の溶液。
- (3) 水性溶液である、(1)に記載の溶液。
- (4) 医薬品製剤である、(1)に記載の溶液。
- (5) 多価カチオン性イオンを含有する、(1)に記載の溶液。
- (6) 多価カチオン性イオンを1mM~1000mMの濃度で含有する、(5)に記載の溶液。
- (7) 多価カチオン性イオンが、Mgイオン又はArgイオンである、(5)に記載の溶液。
- (8) さらに糖類を含有する、(5)に記載の溶液。
- (9) pHが5~8である、(1)に記載の溶液。
- (10) IgM以外のヒト由来の他のタンパク質を本質的に含有しない、(1)に記載の溶液。
- (11) IgM以外のタンパク質を本質的に含有しない、(1)に記載の溶液。
- (12) 高濃度の免疫グロブリンを含有する溶液を安定化する方法であって、免疫グロブリンがIgMであり、溶液に多価カチオン性イオンを添加する方法。
- (13) 溶液がIgMを1mg/mLより高濃度で含有する、(12)に記載の方法。
- (14) 溶液が水性溶液である、(12)に記載の方法。
- (15) 溶液が医薬品製剤である、(12)に記載の方法。
- (16) 多価カチオン性イオンを1mM~1000mMの濃度で含有するように、溶液に多価カチオン性イオンを添加する、(12)に記載の方法。
- (17) 多価カチオン性イオンが、Mgイオン又はArgイオンである、(12)に記載の方法。
- (18) さらに糖類を添加する、(12)に記載の方法。
- (19) 溶液のpHが5~8である、(12)に記載の方法。
- (20) 溶液が、IgM以外のヒト由来の他のタンパク質を本質的に含有しない、(12)に記載の方法。
- (21) 溶液が、IgM以外のタンパク質を本質的に含有しない、(12)に記載の方法。
- (22) 高濃度の免疫グロブリンが安定化された溶液を製造する方法であって、免疫グロブリンがIgMであり、溶液に多価カチオン性イオンを添加する方法。

- (23) 溶液がIgMを1mg/mLより高濃度で含有する、(22)に記載の方法。
- (24) 溶液が水性溶液である、(22)に記載の方法。
- (25) 溶液が医薬品製剤である、(22)に記載の方法。
- (26) 多価カチオン性イオンを1mM~1000mMの濃度で含有するように、溶液に多価カチオン性イオンを添加する、(22)に記載の方法。
- (27) 多価カチオン性イオンが、Mgイオン又はArgイオンである、(22)に記載の方法。
- (28) さらに糖類を添加する、(22)に記載の方法。
- (29) 溶液のpHが5~8である、(22)に記載の方法。
- (30) 溶液が、IgM以外のヒト由来の他のタンパク質を本質的に含有しない、(22)に記載の方法。
- (31) 溶液が、IgM以外のタンパク質を本質的に含有しない、(22)に記載の方法。
- (32) (22)から(31)のいずれかの方法により製造された溶液。

**【発明の効果】****【0017】**

本発明により、高濃度のIgMを溶液中にて安定化することが可能となった。本発明によれば、IgMを有効成分とする医薬製剤を長期間安定に保存することが可能であるため、本発明は特に抗体製剤の調製に大きく貢献しうるものである。

**【発明を実施するための最良の形態】****【0018】**

本発明において「IgM」とはH鎖の定常領域として $\mu$ 鎖の定常領域を有し、かつ5量体または6量体の構造を持つイムノグロブリンを言う。一方、本発明におけるIgMを構成する可変領域の由来は限定されない。したがって、 $\mu$ 鎖由来の可変領域に加えて、IgG由来の可変領域やその部分構造を含むことができる。可変領域の部分構造としては、フレームワークやCDRを示すことができる。なお本発明におけるIgMは、形質転換細胞に導入された外来性のIgM遺伝子の発現産物を言う。

**【0019】**

さらに、本発明のIgMを構成する定常領域が由来する動物種も限定されない。つまり本発明のIgMは、IgMタイプのイムノグロブリンを有するあらゆる動物種に由来するIgM定常領域を含む。IgMを体内への投与に用いる場合には、少なくともその定常領域は、投与対象となる種と同じ種に由来することが望ましい。したがって、ヒトへの投与を目的とする場合には、少なくとも定常領域がヒト由来であることが望ましい。ヒト由来の定常領域と、他の動物種、あるいはヒト由来であるが他の個体に由来する可変領域とで構成されるIgMは、キメラ抗体と呼ばれる。定常領域に加えて、可変領域のフレームワークもヒト由来としたIgMは、ヒトへの投与用のIgMとして更に好ましいIgMである。可変領域のフレームワークの構造を維持し、CDRのみを他の動物種の抗体と組み換えられた抗体は、ヒト化抗体と呼ばれている。

**【0020】**

本発明において「高濃度の免疫グロブリン (IgM)」とは、溶液中のIgMの含有量が1mg/mLより高濃度であることを意味する。本発明の溶液は、IgMの含量が1mg/mL~200mg/mLであることが好ましい。本発明によれば、10mg/mLより高濃度 (例えば、20mg/mL以上、25mg/mL以上) であっても、IgMの安定化を図ることができる。

**【0021】**

本発明において、水溶性会合体の増加を抑制する場合は、多価カチオン性イオンを添加することが好ましい。本発明において使用できる「多価カチオン性イオン」は、2価以上のカチオン性イオンであり、例えば、Mg<sup>++</sup>、Ca<sup>++</sup>、Zn<sup>++</sup>、Fe<sup>++</sup>、塩基性アミノ酸等を使用することができる。塩基性アミノ酸としては、例えば、Arginine、Lysine、L-lysine-L-glutamate、L-arginine-L-glutamate等を使用することができる。好ましい多価カチオン性イオンとしては、Mg<sup>++</sup>又はArginineが挙げられる。本発明において使用できる「多価カ



チオン性イオン」を除くカチオン性イオンとしては、1価のカチオン性イオンであり、例えばNa<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>が挙げられる。

【0022】

溶液に添加されるカチオン性イオンあるいは多価カチオン性イオンの濃度は、通常、1mM~1000mMであり、好ましくは10mM~500mMであり、さらに好ましくは50mM~200mMである。

【0023】

本発明の溶液は、カチオン性イオンあるいは多価カチオン性イオンに加えて、糖類を含有してもよい。好ましい糖類としては、トレハロース、スクロース、ソルビトールを挙げることができる。

【0024】

本発明において使用できる緩衝液種としては、例えば、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液が挙げられる。

【0025】

本発明における「安定化」とは、保存中に生じる水溶性のIgM会合体の増加を抑制すること、及び／又は、保存中に生じる不溶性のIgM会合体（沈殿物）の増加を抑制すること及び／又は、水溶性のIgMの機能を保持していることをいい、好ましくは、保存中に生じる水溶性のIgM会合体の増加を抑制することをいう。

【0026】

本発明における「水溶性の会合体」とは、IgMの2量体、3量体などの多量体で水溶性のものをいう。水溶性の会合体は、例えば、ゲルろ過クロマトグラフィーで検出することができる。IgM高濃度溶液の安定化は、例えば、つぎの式により求まる会合体増加抑制率により測定することができる。

会合体増加抑制率 =  $(A-B)/A \times 100$

A: 多価カチオン性イオンを添加しないIgM高濃度溶液（コントロール）の会合体増加率

B: 多価カチオン性イオンを添加したIgM高濃度溶液（被験試料）の会合体増加率

【0027】

本発明の溶液は、高濃度のIgMを含有する溶液に多価カチオン性イオンを添加してから1ヶ月後の会合体増加抑制率が、好ましくは10%以上、より好ましくは30%以上、さらに好ましくは50%以上、更に好ましくは80%以上のものである。

【0028】

本発明の溶液は、IgM以外のヒト由来の他のタンパク質を含有しない溶液であることが好ましい。さらに好ましくは、IgM以外のタンパク質であって、安定化剤としての効果を示し得る量以上のタンパク質を含有しない溶液である。本願の溶液が医薬品製剤である場合は、IgM以外のヒト由来のタンパク質であって、医薬品の原薬及び／又は医薬品として許容される量以上のタンパク質を含有しない溶液であることが好ましい。

【0029】

本発明の医薬品製剤の剤形に特に限定はなく、任意の剤形とすることが可能である。剤形としては、例えば、溶液製剤、凍結乾燥製剤を挙げることができる。また、溶液製剤としては、冷所保存製剤、常温保存製剤、凍結製剤などが挙げられる。また、本発明の医薬品製剤の投与ルートにも限定はなく、任意の投与ルートを用いることが可能である。したがって、医薬品製剤の使用目的に応じて、経口、非経口投与のいずれでもありうる。

【0030】

非経口投与のための具体的な剤型として、注射剤型、経鼻投与剤型、経肺投与剤型、経皮投与型などを示すことができる。注射剤型の例としては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などにより全身または局部的に投与することができる。

【0031】

本発明の方法により、安定化したIgMは、それ自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化した薬剤として投与することもできる。例えば、水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で使用でき

る。また、例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、ベヒクル、防腐剤などと適宜組み合わせ、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。これら製剤における有効成分量は、指示された範囲の適当な容量が得られるように調節することができる。

#### 【0032】

注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが利用される。補助剤には、具体的には、例えばスクロース、D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウム等を利用することができる。医薬組成物には、適当な溶解補助剤を加えることもできる。例えばアルコールや非イオン性界面活性剤は、溶解補助剤として好ましい。アルコールとしては、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール等を示すことができる。また非イオン性界面活性剤としては、例えばポリソルベート80、あるいはHCO-50を用いることができる。また、塩化ベンザルコニウム等の陽イオン性界面活性剤も使用できる。

#### 【0033】

油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なバイアルあるいはアンプルに充填される。

#### 【0034】

本発明の溶液を医薬品製剤とする場合は、pH5~8であることが好ましく、特に好ましくはpH5~7である。

#### 【0035】

医薬品製剤は、対象疾患、患者の年齢、症状により適宜投与量を選択することができる。例えば、一回につき体重1kgあたり0.0001mgから1000mgの範囲で選ぶことが可能である。あるいは、例えば、患者あたり0.001~100000mg/bodyの範囲で投与量を選ぶことができる。しかしながら、本発明の医薬品製剤はこれらの投与量に制限されるものではない。その他、本発明の溶液製剤等の調製に関しては、WO2002/096457が参照として、本明細書に組み入れられる。

#### 【実施例】

#### 【0036】

以下、実施例により、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

#### 【実施例1】

以下の実施例では、IgMとして、参考例1で作製した組換え型抗ガングリオシドGM3ヒト抗体（以下、「MABON-01」という）を使用した。MABON-01溶液を濃縮し、約9 mg/mLの高濃度溶液を調製した。これを透析膜SLIDE-A-LYZER Dialysis Cassette 10000MWCO (PIERCE)により透析を行い、以下の1.~6.の緩衝液に透析し、緩衝液置換を行った。

1. 20mM sodium acetate, 300mM NaCl, pH5.0 / acetate pH5.01.
1. 20mM sodium acetate, 300mM NaCl, pH5.5 / acetate pH5.52.
1. 20mM sodium acetate, 300mM NaCl, pH6.0 / acetate pH6.03.
1. 20mM sodium citrate, 300mM NaCl, pH5.0 / citrate pH5.04.
1. 20mM sodium citrate, 300mM NaCl, pH5.5 / citrate pH5.55.
1. 20mM sodium citrate, 300mM NaCl, pH6.0 / citrate pH6.01.

#### 【0037】

得られた溶液を回収し、各サンプルのMABON-01の濃度を8.4 mg/mLに統一し、保存容器M ultiply-Safecup 0.1ml Biosph. (SARSTEDT)に充填した。これらのサンプルの安定性試験

を4℃で実施した。サンプルはinitial、4℃-2ヶ月で評価した。サンプルの安定性は、ゲルろ過クロマトグラフィーによるmonomer残存率の変化により評価した。ゲルろ過クロマトグラフィーはカラムとして、G4000SWx1 (TOSOH)を用いた。50 mM sodium phosphate, 500 mM KCl, pH 7.4の溶液を移動相として使用した。ゲルろ過クロマトグラフィーの会合体ピーク面積と単量体ピーク面積の値より、試料のmonomer残存率を算出した。各サンプルのinitialにおけるmonomer残存率を100%とし、4℃-2ヶ月のmonomer残存率を表1に示した。

【0038】

【表1】

pH	residual percent/%	
	acetate	citrate
5.0	99.33	99.16
5.5	99.51	99.3
6.0	98.92	98.9

【0039】

これより、300mM NaClを含むpH5.0～pH6.0のクエン酸あるいは酢酸緩衝液において、安定な高濃度MABON-01溶液を調製することができた。

【0040】

以下の実施例において、クエン酸緩衝液を用いたpH5.5の溶液に多価カチオンを添加することでさらに水溶性の会合体の増加を抑制し安定化した高濃度MABON-01溶液を示す。

【0041】

[実施例2]

MABON-01溶液を濃縮し、約18 mg/mLの高濃度溶液を調製した。これを透析膜SLIDE-A-LYZE R Dialysis Cassette 10000MWCO (PIERCE)により透析を行い、20 mM citrate, 300 mM NaCl, pH 5.5の溶液に緩衝液を置換を行った（添加物なしの状態では、緩衝液種、pHを最適化してある）。この高濃度MABON-01溶液を以下の1.～9.の緩衝液に透析EasySep (TOMY)を用いて透析し、緩衝液置換を行った。

1. 20 mM sodium citrate, 300 mM NaCl, pH5.5 / none
2. 20 mM sodium citrate, 900 mM NaCl, pH5.5 / NaCl
3. 20 mM sodium citrate, 300 mM NaCl, 200 mM MgCl<sub>2</sub>, pH5.5 / MgCl<sub>2</sub>
4. 20 mM sodium citrate, 300 mM NaCl, 200 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH5.5 / Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
5. 20 mM sodium citrate, 300 mM NaCl, 100 mM L-glutamic acid sodium salt, pH 5.5 / L-glutamic acid sodium salt
6. 20 mM sodium citrate, 300 mM NaCl, 100 mM L-arginine hydrochloride, pH 5.5 / L-arginine hydrochloride
7. 20 mM sodium citrate, 300 mM NaCl, 100 mM N-acetyltryptophan sodium salt, pH 5.5 / N-acetyltryptophan sodium salt
8. 20 mM sodium citrate, 300 mM NaCl, 10mM urea, pH 5.5 / urea
9. 20 mM sodium citrate, 300 mM NaCl, 100mM trehalose, pH 5.5 / trehalose

【0042】

得られた溶液を回収し、各サンプルのMABON-01の濃度を18.5 mg/mLに統一し、保存容器Multiply-Safecup 0.1ml Biosph. (SARSTEDT)に充填した。これらのサンプルの安定性試験を25℃で実施した。サンプルはinitial、25℃-1ヶ月、及び、25℃-2ヶ月で評価した。サンプルの安定性は、ゲルろ過クロマトグラフィーによる会合体含有率の変化（増加）により評価した。ゲルろ過クロマトグラフィーはカラムとして、G4000SWx1 (TOSOH)を用いた。50 mM sodium phosphate, 500 mM KCl, pH 7.4の溶液を移動相として使用した。ゲルろ過クロマトグラフィーの会合体ピーク面積と単量体ピーク面積の値より、試料の会合体含有率を算出した。各サンプルの25℃-1ヶ月、及び、25℃-2ヶ月の会合体含有率からinitialにおける会合体含有率を差し引いた値をΔaggregateとして、図1に示した。

## 【0043】

その結果、1. none(300mM NaClを含む)に比べて、2. NaCl(900mM NaClを含む)は会合体の増加が抑制された。これより、NaCl濃度を高くすることによって、会合体の増加を抑制できることが分かった。

## 【0044】

一方、2. NaCl(900mM NaClを含む)、3.  $MgCl_2$ (300mM NaCl+200mM  $MgCl_2$ を含む)、4.  $Na_2SO_4$ (300mM NaCl+200mM  $Na_2SO_4$ を含む)において、これらは同じイオン強度(いずれもイオン強度0.9M)であるにも関わらず、2価のカチオンを含む $MgCl_2$ は著しい安定化効果が認められ、2価のアニオンを含む4.  $Na_2SO_4$ の安定化効果は2. NaClと同程度であった。

## 【0045】

また、同じイオン性のアミノ酸であるL-glutamic acid sodium saltを含む5. L-glutamic acid sodium saltでは安定化効果が認められないにも関わらず、2価のカチオンであるL-arginine hydrochlorideを含む6. L-arginine hydrochlorideでは、3.  $MgCl_2$ と同等の安定化効果が認められた。

## 【0046】

このような結果から、NaCl等の塩を加えイオン強度を高くすることによって、会合体を抑制できることが分かった。さらに、同じイオン強度においても、2価のカチオンであるマグネシウムイオンやアルギニンを用いることによってさらに高い会合体抑制効果が得られることが分かった。一方、2価のアニオンである硫酸イオンやグルタミン酸では高い会合体抑制効果が得られない。すなわち、マグネシウムイオンやアルギニン等の2価のカチオンがMABON-01と相互作用することで、MABON-01の会合化を著しく抑制し、安定な高濃度溶液を調製することが出来た。

## 【0047】

## [実施例3]

MABON-01溶液を濃縮し、約19 mg/mLのMABON-01高濃度溶液を調製した。これを以下の1.~9.の緩衝液に透析膜EasySep (TOMY)を用いて透析し、緩衝液置換を行った。

1. 20 mM sodium citrate, 300 mM NaCl, pH5.51.
2. 20 mM sodium citrate, 300 mM NaCl, 10 mM  $MgCl_2$ , pH5.52.
3. 20 mM sodium citrate, 300 mM NaCl, 50 mM  $MgCl_2$ , pH5.53.
4. 20 mM sodium citrate, 300 mM NaCl, 200 mM  $MgCl_2$ , pH5.54.
5. 20 mM sodium citrate, 300 mM NaCl, 200 mM  $MgCl_2$ , 100mM trehalose, pH5.55.
6. 20 mM sodium citrate, 300 mM NaCl, 10 mM L-arginine hydrochloride, pH5.56.
7. 20 mM sodium citrate, 300 mM NaCl, 50 mM L-arginine hydrochloride, pH5.57.
8. 20 mM sodium citrate, 300 mM NaCl, 100 mM L-arginine hydrochloride, pH5.58.
9. 20 mM sodium citrate, 300 mM NaCl, 100 mM L-arginine hydrochloride, 100mM trehalose, pH 5.5

## 【0048】

得られた溶液を回収し、各サンプルのMABON-01の濃度を18.9 mg/mLに統一し、保存容器Multiply-Safecup 0.1ml Biosph. (SARSTEDT)に充填した。これらのサンプルの安定性試験を実施した。サンプルはinitial、4℃-3ヶ月で評価した。サンプルの安定性は、ゲルろ過クロマトグラフィーによる会合体含有率の変化(増加)により評価した。ゲルろ過クロマトグラフィーはカラムとして、G4000SWx1 (TOSOH)を用いた。50 mM sodium phosphate, 500 mM KCl, pH 7.4の溶液を移動相として使用した。ゲルろ過クロマトグラフィーの会合体ピーク面積と単量体ピーク面積の値より、試料の会合体含有率を算出した。各サンプルのinitial、4℃-3ヶ月における会合体含有率を図2に示した。

## 【0049】

その結果、 $MgCl_2$ とL-arginine hydrochlorideの濃度依存的に会合体抑制効果が見られた。すなわち、 $MgCl_2$ とL-arginine hydrochlorideの濃度を高くすることによって、大きな安定化効果が得られた。さらに、trehalose単独では安定化効果がないものの(実施例2及び実施例4) 200 mM  $MgCl_2$ あるいは100 mM L-arginine hydrochloride存在下に100 m

M trehaloseを添加することによって、安定化効果が得られた。

【0050】

〔実施例4〕

MABON-01溶液を濃縮し、より高濃度の約27 mg/mLのMABON-01高濃度溶液を調製した。これを以下の1.~3.の緩衝液に透析膜EasySep (TOMY)を用いて透析し、緩衝液置換を行った。

1. 20 mM sodium citrate, 300 mM NaCl, pH5.5 / none
2. 20 mM sodium citrate, 300 mM NaCl, 200 mM MgCl<sub>2</sub>, pH5.5 / MgCl<sub>2</sub>
3. 20 mM sodium citrate, 300 mM NaCl, 100mM trehalose, pH 5.5 / trehalose

【0051】

得られた溶液を回収し、各サンプルのMABON-01の濃度を26.8 mg/mLに統一し、保存容器Multiply-Safecup 0.1ml Biosph. (SARSTEDT)に充填した。これらのサンプルの安定性試験を実施した。サンプルはinitial、4℃-4ヶ月および25℃-4ヶ月で評価した。サンプルの安定性は、ゲルろ過クロマトグラフィーによる会合体含有率の変化(増加)により評価した。ゲルろ過クロマトグラフィーはカラムとして、G4000SWx1 (TOSOH)を用いた。50 mM sodium phosphate, 500 mM KCl, pH 7.4の溶液を移動相として使用した。ゲルろ過クロマトグラフィーの会合体ピーク面積と単量体ピーク面積の値より、試料の会合体含有率を算出した。各サンプルのinitial、4℃-4ヶ月および25℃-4ヶ月における会合体含有率を図3に示した。

【0052】

その結果、4℃と25℃において、ともにMgCl<sub>2</sub>の安定化効果が認められた。一方、一般的なタンパク質の安定化剤として知られ、Journal of Immunological Methods 1995, 181(1), 37-43において凍結乾燥時のIgMの安定化効果が認められているtrehaloseに関しては、ほとんど効果が認められなかった(図3)。

【0053】

〔参考例1〕ガングリオシドGM3に対する組換え型ヒト抗体の作製

1.1 抗ガングリオシドGM3ヒト抗体H鎖遺伝子の構築

ガングリオシドGM3に結合するヒト抗体のH鎖をコードする遺伝子は、Epstein-Barrウイルスで形質転換されたヒトB細胞(以下、抗ガングリオシドGM3ヒト抗体発現B細胞と表記する)より抽出したTotal RNAを用いて、RT-PCR法によって増幅した。

【0054】

Total RNAは、RNeasy Plant Mini Kits (QIAGEN社製)を用いて $1 \times 10^7$ 細胞の抗ガングリオシドGM3ヒト抗体発現B細胞より抽出した。Hoonらが報告している抗ガングリオシドGM3ヒト抗体遺伝子の塩基配列(Cancer Research 1993; 53: 5244-5250)に基づいて、2本のオリゴヌクレオチド(LMH-f3、LMH-r3)を設計した。LMH-f3(配列番号: 7)はセンス方向で、LMH-r3(配列番号: 8)はアンチセンス方向でそれぞれ合成した。 $1 \mu\text{g}$ のTotal RNAを使用して、SMART RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH社製)を用い5'末端側と3'末端側に分割して遺伝子断片を増幅した。5'末端側遺伝子の増幅は合成オリゴヌクレオチドLMH-r3を用い、3'末端側遺伝子の増幅は合成オリゴヌクレオチドLMH-f3を用いた。逆転写反応は42℃で1時間30分間反応させた。

【0055】

PCR反応溶液(50  $\mu\text{L}$ )の組成を次に示す。

- 5  $\mu\text{L}$ の10×Advantage 2 PCR Buffer、
  - 5  $\mu\text{L}$ の10×Universal Primer A Mix、
  - 0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、
  - 1  $\mu\text{L}$ のAdvantage 2 Polymerase Mix、
  - (以上の成分はいずれもCLONTECH社製)
  - 2.5  $\mu\text{L}$ の逆転写反応産物、
  - 10pmoleの合成オリゴヌクレオチドLMH-f3またはLMH-r3
- また反応温度条件は次のとおりである。
- 94℃の初期温度にて30秒間、

94℃/5秒間、72℃/3分間のサイクルを5回  
94℃/5秒間、70℃/10秒間、72℃/3分間のサイクルを5回反復  
94℃/5秒間、68℃/10秒間、72℃/3分間のサイクルを25回反復  
最後に反応産物を72℃で7分間加熱した。

#### 【0056】

PCR産物はQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて、アガロースゲルから精製した後、pGEM-T Easyベクター (Promega社製) ヘクローニングした。塩基配列決定の後、5'末端側遺伝子を含むベクターを制限酵素ApaI (宝酒造社製) 及びSacII (宝酒造社製) で消化して得られる約1.1kbpの断片、および3'末端側遺伝子を含むベクターを制限酵素ApaI (宝酒造社製) 及びNotI (宝酒造社製) で消化して得られる約1.1kbpの断片を混合し、pBluescript KS+ベクター (東洋紡社製) ヘクローニングし、完全長抗ガングリオシドGM3ヒト抗体H鎖遺伝子を得た。

#### 【0057】

動物細胞発現用ベクターヘクローニングするために、合成オリゴヌクレオチドLMH-fxho、LMH-rsalを用いて完全長の遺伝子断片を増幅した。LMH-fxho (配列番号: 11) は前方プライマーで抗ガングリオシドGM3ヒト抗体H鎖遺伝子の5'末端にハイブリダイズし、かつXhoI制限酵素認識配列ならびにコザック配列を持つように、またLMH-rsal (配列番号: 12) は後方プライマーで抗ガングリオシドGM3ヒト抗体H鎖遺伝子の3'末端にハイブリダイズし、SalI制限酵素認識配列を持つようにそれぞれ設計した。

#### 【0058】

PCR反応溶液(50 $\mu$ L)の組成を次に示す。

5 $\mu$ Lの10 $\times$ PCR Buffer、

1mM MgSO<sub>4</sub>

0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、

1ユニットのDNAポリメラーゼKOD-Plus-

(以上の成分はいずれも東洋紡社製)、

10ngの完全長抗ガングリオシドGM3ヒト抗体H鎖遺伝子を含むpBluescript KS+ベク

ター、

10pmoleの合成オリゴヌクレオチドLMH-fxho、LMH-rsal

また反応温度条件は次のとおりである。

94℃の初期温度にて2分間、

94℃/15秒間、60℃/30秒間、68℃/2分間のサイクルを30回反復

最後に反応産物を72℃で5分間加熱した。

#### 【0059】

増幅した遺伝子断片は、制限酵素XhoI (宝酒造社製) および制限酵素SalI (宝酒造社製) で消化した後に、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN社製) を用いて精製し、pUCAGの制限酵素XhoI部位に連結し、クローニングした。本ベクターpUCAGは、pCXN (Niwaら、Gene 1991; 108: 193-200) を制限酵素BamHIで消化して得られる2.6kbpの断片をpUC19ベクター (東洋紡社製) の制限酵素BamHI部位に連結し、クローニングしたベクターである。完成したプラスミドをpUCAG/L612Hと命名した。本プラスミドに含まれる抗ガングリオシドGM3ヒト抗体H鎖の塩基配列およびアミノ酸配列を配列番号: 1 及び配列番号: 2 に示す。

#### 【0060】

##### 1.2 抗ガングリオシドGM3ヒト抗体L鎖遺伝子の構築

抗ガングリオシドGM3ヒト抗体のL鎖をコードする遺伝子は抗ガングリオシドGM3ヒト抗体発現B細胞より抽出したTotal RNAを用いて、RT-PCR法によって増幅した。Total RNAは、上記と同様にして抗ガングリオシドGM3ヒト抗体発現B細胞より抽出した。Hoonらが報告している抗ガングリオシドGM3ヒト抗体遺伝子の塩基配列 (Cancer Research 1993; 53: 5244-5250) に基づいて、2本のオリゴヌクレオチド (LML-f1、LML-r1) を設計した。LML-f1 (配列番号: 9) はセンス方向で、LML-r1 (配列番号: 10) はアンチセンス方向でそ

れぞれ合成した。

【0061】

1 $\mu$ gのTotal RNAを使用して、SMART RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH社製) を用い5'末端側と3'末端側に分割して遺伝子断片を増幅した。5'末端側遺伝子の増幅は合成オリゴヌクレオチドLML-r1を用い、3'末端側遺伝子の増幅は合成オリゴヌクレオチドLML-f1を用いた。逆転写反応は42℃で1時間30分間反応させた。

【0062】

PCR反応溶液(50 $\mu$ L)の組成を次に示す。

5 $\mu$ Lの10 $\times$ Advantage 2 PCR Buffer、

5 $\mu$ Lの10 $\times$ Universal Primer A Mix、

0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 、

1 $\mu$ LのAdvantage 2 Polymerase Mix

(以上の成分はいずれもCLONTECH社製)

2.5 $\mu$ Lの逆転写反応産物、

10pmoleの合成オリゴヌクレオチドLML-f1またはLML-r1

また反応温度条件は次のとおりである。

94℃の初期温度にて30秒間、

94℃/5秒間、72℃/3分間のサイクルを5回反復

94℃/5秒間、70℃/10秒間、72℃/3分間のサイクルを5回反復、

94℃/5秒間、68℃/10秒間、72℃/3分間のサイクルを25回反復

最後に反応産物を72℃で7分間加熱した。

【0063】

PCR産物はQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて、アガロースゲルから精製した後、pGEM-T Easyベクター (Promega社製) ヘクローニングした。塩基配列決定の後、5'末端側遺伝子を含むベクターを制限酵素EcoRI (宝酒造社製) で消化して得られる約0.7kbpの断片、および3'末端側遺伝子を含むベクターを制限酵素EcoRI (宝酒造社製) で消化して得られる約0.9kbpの断片を混合し、合成オリゴヌクレオチドLML-feco、LML-rnotを用いて完全長の遺伝子断片を増幅した。LML-feco (配列番号: 13) は前方プライマーで抗ガングリオシドGM3ヒト抗体L鎖遺伝子の5'末端にハイブリダイズし、かつEcoRI制限酵素認識配列ならびにコザック配列を持つように、またLML-rnot (配列番号: 14) は後方プライマーで抗ガングリオシドGM3ヒト抗体L鎖遺伝子の3'末端にハイブリダイズし、NotI制限酵素認識配列を持つようにそれぞれ設計した。

【0064】

PCR反応溶液(50 $\mu$ L)の組成を次に示す。

5 $\mu$ Lの10 $\times$ PCR Buffer、

1mM MgSO<sub>4</sub>、

0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 、

1ユニットのDNAポリメラーゼKOD-Plus-

(以上の成分はいずれも東洋紡社製)

5'末端側遺伝子断片、

3'末端側遺伝子断片、

10pmoleの合成オリゴヌクレオチドLML-feco、LML-rnot

また反応温度条件は次のとおりである。

94℃の初期温度にて2分間

94℃/15秒間、60℃/30秒間、68℃/2分間のサイクルを30回反復

最後に反応産物を72℃で5分間加熱した。

【0065】

増幅した遺伝子断片は、制限酵素EcoRI (宝酒造社製) および制限酵素NotI (宝酒造社製) で消化した後に、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN社製) を用いて精製し、pCXND3の制限酵素EcoRIおよびNotI切断部位に連結し、クローニングした。

## 【0066】

本ベクターpCXND3の構築の流れについて、以下に述べる。DHFR-ΔE-rvH-PM1-f (W092/19759参照)の抗体H鎖遺伝子とベクターを分割するために、制限酵素EcoRI/SmaI部位で消化し、ベクター側のみ回収した後に、EcoRI-NotI-BamHI adaptor (宝酒造社製)をクローニングした。このベクターをpCHOIと命名した。

## 【0067】

pCHOIのDHFR遺伝子発現部位をpCXN (Niwaら, Gene 1991; 108:193-200)の制限酵素HindIII部位にクローニングしたベクターをpCXND3と命名した。また、L鎖遺伝子断片をpCXND3にクローニングし、完成したプラスミドをpCXND3/L612Lと命名した。本プラスミドに含まれる抗ガングリオシドGM3ヒト抗体L鎖の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号: 3および配列番号: 4に示す。

## 【0068】

## 1.3 抗ガングリオシドGM3ヒト抗体の発現ベクターの構築

抗ガングリオシドGM3ヒト抗体発現ベクターを作製するために、pUCAG/L612Hを制限酵素HindIII (宝酒造社製)で消化して得られる約4.0kbpの断片をpCXND3/L612Lの制限酵素HindIII切断部位に連結し、クローニングした。完成したプラスミドをpCXND3/L612IgMと命名した。本プラスミドは動物細胞内でネオマイシン耐性遺伝子、DHFR遺伝子、抗ガングリオシドGM3ヒト抗体遺伝子を発現する。

## 【0069】

## 1.4 抗ガングリオシドGM3ヒト抗体J鎖遺伝子および発現ベクターの構築

抗ガングリオシドGM3ヒト抗体のJ鎖をコードする遺伝子は抗ガングリオシドGM3ヒト抗体発現B細胞より抽出したTotal RNAを用いて、RT-PCR法によって増幅した。Total RNAは、上記と同様にして抗ガングリオシドGM3ヒト抗体発現B細胞より抽出した。GenBankに登録されているヒト抗体J鎖遺伝子の塩基配列 (GenBank番号: M12759)に基づいて、2本のオリゴヌクレオチド (J-f1、J-r1)を設計し、合成した。J-f1 (配列番号: 15)はセンス方向でヒト抗体J鎖遺伝子Exon3にハイブリダイズし、J-r1 (配列番号: 16)はアンチセンス方向でヒト抗体J鎖遺伝子Exon4にハイブリダイズする。

## 【0070】

1μgのTotal RNAを使用して、SMART RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH社製)を用い5'末端側と3'末端側に分割して遺伝子断片を増幅した。5'末端側遺伝子の増幅は合成オリゴヌクレオチドJ-r1を用い、3'末端側遺伝子の増幅は合成オリゴヌクレオチドJ-f1を用いた。逆転写反応は42℃で1時間30分間反応させた。

## 【0071】

PCR反応溶液(50μL)の組成を次に示す。

5μLの10×Advantage 2 PCR Buffer、  
5μLの10×Universal Primer A Mix、  
0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、  
1μLのAdvantage 2 Polymerase Mix  
(以上の成分はいずれもCLONTECH社製)

2.5μLの逆転写反応産物、  
10pmoleの合成オリゴヌクレオチドJ-f1またはJ-r1

また反応温度条件は次のとおりである。

94℃の初期温度にて30秒間

94℃/5秒間、72℃/3分間のサイクルを5回反復

94℃/5秒間、70℃/10秒間、72℃/3分間のサイクルを5回反復

94℃/5秒間、68℃/10秒間、72℃/3分間のサイクルを25回反復

最後に反応産物を72℃で7分間加熱した。

## 【0072】

PCR産物はQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて、アガロースゲルから精製した後、pGEM-T Easyベクター (Promega社製)へクローニングした。



## 【0073】

塩基配列決定の後、5'末端側遺伝子を含むベクターを制限酵素EcoRI（宝酒造社製）で消化して得られる約0.5kbpの断片、および3'末端側遺伝子を含むベクターを制限酵素EcoRI（宝酒造社製）で消化して得られる約1.0kbpの断片を混合し合成オリゴヌクレオチドJ-feco、J-rxbaを用いて完全長の遺伝子断片を増幅した。

## 【0074】

J-feco（配列番号：17）は前方プライマーで抗ガングリオシドGM3ヒト抗体J鎖遺伝子の5'末端にハイブリダイズし、かつEcoRI制限酵素認識配列ならびにコザック配列を持つように、またJ-rxba（配列番号：18）は後方プライマーで抗ガングリオシドGM3ヒト抗体J鎖遺伝子の3'末端にハイブリダイズし、XbaI制限酵素認識配列を持つようにそれぞれ設計した。

## 【0075】

PCR反応溶液(50 $\mu$ L)の組成を次に示す。

5 $\mu$ Lの10 $\times$ PCR Buffer、

1mM MgSO<sub>4</sub>、

0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、

1ユニットのDNAポリメラーゼKOD-Plus-

(以上の成分はいずれも東洋紡社製)

5'末端側遺伝子断片、

3'末端側遺伝子断片、

10pmoleの合成オリゴヌクレオチドJ-feco、J-rxba

また反応温度条件は次のとおりである。

94℃の初期温度にて2分間

94℃/15秒間、60℃/30秒間、68℃/2分間のサイクルを30回反復

最後に反応産物を72℃で5分間加熱した。

## 【0076】

増幅した遺伝子断片は、制限酵素EcoRI（宝酒造社製）および制限酵素XbaI（宝酒造社製）で消化した後に、QIAquick PCR Purification Kit（QIAGEN社製）を用いて精製し、pCOSII-Zeoの制限酵素EcoRIおよびXbaI切断部位に連結し、クローニングした。

## 【0077】

本ベクターpCOSII-Zeoは、上述のpCHOIのDHFR遺伝子発現部位を除去し、Zeocin耐性遺伝子発現部位をクローニングしたベクターである。完成したプラスミドをpCOSII-Zeo/J chainと命名した。本プラスミドに含まれる抗ガングリオシドGM3ヒト抗体J鎖の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号：5および配列番号：6に示す。

## 【0078】

## 1.5 動物細胞を用いた抗ガングリオシドGM3ヒト抗体の発現

CHO細胞（DG44株）を用いた安定発現細胞株の作製は次のようにして行った。Gene PulserII（BioRad社製）を用いたエレクトロポレーション法により遺伝子導入した。

## 【0079】

J鎖を発現しない細胞株の遺伝子導入について以下に述べる。抗ガングリオシドGM3ヒト抗体発現ベクターpCXND3/L612IgM (25 $\mu$ g) とPBSに懸濁したCHO細胞（1 $\times$ 10<sup>7</sup>細胞/ml）の0.75mlを混合したものを氷上で10分間冷却し、キュベットに移した後に1.5kV、25 $\mu$ FDの容量にてパルスを与えた。

## 【0080】

室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、HT supplement（Invitrogen社製）を1倍濃度で含むCHO-S-SFMII培地（Invitrogen社製）40mLに懸濁した。同様の培地で50倍希釈溶液を作製し、96ウェル培養用プレートに100 $\mu$ l/ウェルで分注した。CO<sub>2</sub>インキュベーター（5%CO<sub>2</sub>）で24時間培養後、Geneticin（Invitrogen社製）を0.5mg/mLになるように添加して2週間培養した。

## 【0081】

Geneticin耐性を示す形質転換細胞のコロニーが観察されたウェルの培養上清中のIgM量について実施例1.6に示す濃度定量法で測定した。抗ガングリオシドGM3ヒト抗体高発現細胞株を順次拡大培養し、抗ガングリオシドGM3ヒト抗体安定発現細胞株CA02、CA15、CA19、CA20、およびCA24を得た。

【0082】

また、J鎖を発現する細胞株の遺伝子導入について以下に述べる。抗ガングリオシドGM3ヒト抗体発現ベクターpCXND3/L612IgM (25 $\mu$ g) およびJ鎖発現ベクターpCOSII-Zeo/J chain (20 $\mu$ g) とPBSに懸濁したCHO細胞 (1 $\times 10^7$ 細胞/ml) の0.75mlを混合したものを氷上で10分間冷却し、キュベットに移した後に1.5kV、25 $\mu$ FDの容量にてパルスを与えた。

【0083】

室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、HT supplement (Invitrogen社製) を1倍濃度で含むCHO-S-SFMII培地 (Invitrogen社製) 40mLに懸濁した。

【0084】

同様の培地で50倍希釈溶液を作製し、96ウェル培養用プレートに100 $\mu$ l/ウェルで分注した。CO<sub>2</sub>インキュベーター (5%CO<sub>2</sub>) で24時間培養後、0.5mg/mL濃度のGeneticin (Invitrogen社製) および0.6mg/mL濃度のZeocin (Invitrogen社製) を添加して2週間培養した。Geneticin、Zeocin耐性を示す形質転換細胞のコロニーが観察されたウェルの培養上清中のIgM量について実施例1.6に示す濃度定量法で測定した。抗ガングリオシドGM3ヒト抗体高発現細胞株を順次拡大培養し、抗ガングリオシドGM3ヒト抗体安定発現細胞株 (CJ15、CJ25、CJ38、CJ45、CJ67) を得た。

【0085】

1.6 培養上清中のIgM濃度の測定

培養上清中のIgM濃度の測定は以下のように行った。Anti-Human IgM (BIOSORCE社製) を1 $\mu$ g/mlになるようにCoating Buffer (0.1M NaHCO<sub>3</sub>, 0.02%NaN<sub>3</sub>) で希釈し、96ウェルELISA用プレートに100 $\mu$ l/ウェルで加え、4℃で24時間以上反応させ、コーティングを行った。

【0086】

さらに、Rinse Bufferで洗浄した後に、200 $\mu$ L/ウェルのDiluent Bufferを加え、室温で1時間以上反応させ、ブロッキングした。Rinse BufferおよびDiluent Bufferの組成はそれぞれ次のとおりである。

Rinse Buffer:

PBS(-)、

0.05% Tween20

Diluent Buffer:

50mM Tris、

1mM MgCl<sub>2</sub>、

0.15M NaCl、

0.05% Tween20、

0.02% NaN<sub>3</sub>、

1% BSA

【0087】

その後、Diluent Bufferで適当に希釈した培養上清を100 $\mu$ L/ウェルで加え、室温で1時間反応させた。Rinse Bufferで洗浄した後に、Goat Anti-Human IgM、Alkaline Phosphatase conjugated (BIOSORCE社製) をDiluent Bufferで4000倍に希釈し、100 $\mu$ L/ウェルで加え、室温で1時間反応させた。最後にRinse Bufferで洗浄した後にアルカリフォスファターゼ基質 (SIGMA社製) を加え、吸光光度計Benchmark Plus (BioRad社製) を用いて、測定波長405nm、対照波長655nmの吸光度を測定した。IgM濃度は抗ガングリオシドGM3ヒト抗体精製品 (Hoonら、Cancer Research 1993; 53: 5244-5250) との比較で算出した。

【0088】

各種抗ガングリオシドGM3ヒト抗体安定発現細胞株を75cm<sup>2</sup>培養フラスコ内で初発細胞密度  $2 \times 10^5$  cells/mLで培養し、培養上清中のIgM濃度を上記の方法で測定した。結果を表2に示す。IgM産生量は培養3日目で約20mg/L、培養7日目で約50mg/Lであり、単一細胞が産生する能力を示す産生能は5~19pg/cell/dayであった。IgMはイムノグロブリンの中でも多量体を形成するために、組換え体は発現量が低く、大量に調製することが困難であるとされていたが、今回の結果より、CHO細胞において高い産生量の組換え型IgM発現細胞が作製できることが明らかになった。

【表2】

J鎖発現	細胞株	培養3日間の産生量 (mg/L)	培養7日間の産生量 (mg/L)	産生能 (pg/cell/day)
無し	CA02	24.1	36.9	14.1
	CA15	11.8	39.7	4.9
	CA19	27.1	62.3	13.1
	CA20	20.2	35.4	10.5
	CA24	25.0	41.5	10.7
有り	CJ15	29.4	N. T.	19.4
	CJ25	24.4	N. T.	18.1
	CJ38	14.9	N. T.	12.4
	CJ45	26.4	N. T.	18.7
	CJ67	18.0	N. T.	12.8

N.T.:Not Tested

【0089】

【参考例2】 会合体の測定 (1)

以下の緩衝液を移動相として用いて、MABON-01のゲル濾過クロマトグラフィー分析を行った。何れの分析でもカラムはTSKgel G4000SW<sub>XL</sub>を用い、流速は0.3 mL/min、検出は280nmにおける吸光度、試料注入量は10  $\mu$ gとした。

1. 50 mM sodium phosphate, 500 mM KCl, pH6.21.
1. 50 mM sodium phosphate, 500 mM KCl, pH6.52.
1. 50 mM sodium phosphate, 500 mM KCl, pH6.83.
1. 50 mM sodium phosphate, 500 mM KCl, pH7.14.
1. 50 mM sodium phosphate, 500 mM KCl, pH7.45.
1. 50 mM sodium phosphate, 300 mM KCl, pH6.56.
1. 50 mM sodium phosphate, 300 mM KCl, pH7.47.
1. 50 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, pH6.58.
1. 50 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, pH7.49.
1. 50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, pH6.510.
1. 50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, pH7.411.

【0090】

得られたクロマトグラムの会合体ピーク面積値と単量体ピーク面積値（ピークの帰属は別途行った）を表3に示す。

【0091】

【表 3】

	KCl				NaCl			
	500 mM		300 mM		500 mM		300 mM	
pH6.2	3073386		—		—		Total Peak Area	
	146342	2927044	—	—	—	—	Aggregate	Monomer
pH6.5	3096904		2959509		3044989		2818198	
	155304	2941600	124880	2834629	127467	2917522	82928	2735270
pH6.8	3074760		—		—		—	
	153682	2921078	—	—	—	—	—	—
pH7.1	3033846		—		—		—	
	154085	2879761	—	—	—	—	—	—
pH7.4	3074597		3098757		3130093		2948932	
	163747	2910850	157320	2941437	144630	2985463	112427	2836505

各セルの上段に総ピーク面積値、下段左に会合体面積値、下段右に単量体面積値を示した。

【0092】

また、全ピーク面積値に対する会合体ピーク面積比率ならびに単量体ピーク面積比率を算出した結果を表4に示す。

【0093】

【表 4】

	KCl				NaCl			
	500 mM		300 mM		500 mM		300 mM	
pH6.2	4.8	95.2	—	—	—	—	Aggregate	Monomer
pH6.5	5.0	95.0	4.2	95.8	4.2	95.8	2.9	97.1
pH6.8	5.0	95.0	—	—	—	—	—	—
pH7.1	5.1	94.9	—	—	—	—	—	—
pH7.4	5.3	94.7	5.1	94.9	4.6	95.4	3.8	96.2

各セルの左に会合体ピーク面積比率、単量体ピーク面積比率を示した。

【0094】

これらの結果から、総ピーク面積値ならびに会合体ピーク面積比率、何れに関しても、pH6.2-7.1の移動相緩衝液を用いた分析に比べてpH7.4の移動相緩衝液を用いた時に塩種ならびに塩濃度の影響が抑えられ、またKCl、NaCl何れの塩を含む移動相緩衝液でも塩濃度が300 mMの移動相緩衝液に比べて500 mMの時にpHの影響が抑えられ、更にNaClを含む移動相緩衝液に比べてKClを含む移動相緩衝液を用いた時に塩濃度もしくは移動相pHの影響が抑えられることがわかった。以上から、MABON-01のゲル濾過クロマトグラフィー分析の移動相条件を、50 mM sodium phosphate, 500 mM KCl, pH7.4と設定した。

【0095】

【参考例3】 会合体の測定 (2)

MABON-01のGPC-MALLS分析を行い、各ピークの分子量を測定した。移動相は50 mM sodium phosphate, 500 mM KCl, pH7.4の緩衝液を、カラムはTSKgel G4000SW<sub>XL</sub>を用いた。流速は0.3 mL/min、検出は280nmにおける吸光度、試料注入量は113  $\mu$ gとした。得られた結果からDebye法によって分子量を算出した。

【0096】

得られたクロマトグラムおよび算出された分子量を重ねて図4に示す。また、図中ピーク1ならびにピーク2の平均分子量と、MABON-01のアミノ酸配列から算出した理論分子量を表5に示す。

【0097】

【表5】

平均分子量		理論分子量	
	M. W. [kDa]		M. W. [kDa]
Peak 1	1,109	単量体	1,034
Peak 2	2,193	二量体	2,068

【0098】

尚、ピーク2は21.5-22.0分、ピーク1は24.5-25.0分の分子量を平均し、平均分子量とした。ピーク1ならびにピーク2の平均分子量がそれぞれ単量体ならびに二量体の理論分子量に近いこと、またピーク2の平均分子量がピーク1の平均分子量の約2倍であることから、ピーク1にはMABON-01単量体が、ピーク2には二量体が含まれることがわかった。

【図面の簡単な説明】

【0099】

【図1】各サンプルにおける25℃-1ヶ月、及び、25℃-2ヶ月の会合体含有率からinitialにおける会合体含有率を差し引いた値を $\Delta$ aggregateとして示す図である。

【図2】各サンプルのinitial、4℃-3ヶ月における会合体含有率を示す図である。

【図3】各サンプルのinitial、4℃-4ヶ月、25℃-4ヶ月における会合体含有率を示す図である。

【図4】MABON-01のGPC-MALLS分析により得られたクロマトグラムおよび算出された分子量を示す図である。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

&lt;120&gt; High-density stabilized IgM solution

&lt;130&gt; C1-A0315

&lt;160&gt; 18

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1779

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1779)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 1

atg	gag	ttt	ggg	ctg	agc	tgg	ctt	ttt	ctt	gtg	gct	att	tta	aaa	ggt	48
Met	Glu	Phe	Gly	Leu	Ser	Trp	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Ile	Leu	Lys	Gly	
1			5				10						15			

gtc	cag	tgt	gag	gtg	cag	ctg	ttg	gat	tct	ggg	gga	ggc	ttg	gta	cag	96
Val	Gln	Cys	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Asp	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	
			20				25						30			

cct	ggg	ggg	tgc	ctg	aga	ctc	tcc	tgt	gca	gcc	tct	gga	ttc	acc	ttt	144
Pro	Gly	Gly	Cys	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	
			35				40					45				

agc	agc	tgt	gcc	atg	agc	tgg	gtc	cgc	cag	gct	cca	ggg	aag	ggg	ctg	192
Ser	Ser	Cys	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	
			50				55				60					

gag	tgg	gtc	tca	gct	att	agt	ggt	agt	ggt	ggt	agc	aca	tac	tac	gca	240
Glu	Trp	Val	Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	
65					70				75						80	

gac	tcc	gtg	aag	ggc	cgg	ttc	acc	atc	tcc	aga	gac	aaa	tcc	aag	aac	288
Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Lys	Ser	Lys	Asn	
				85					90					95		

acg	ttg	tat	ctg	caa	atg	aac	agc	ctg	aga	gcc	gag	gac	acg	gcc	gta	336
Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	

100	105	110	
tat tac tgt gcg aaa ggt ggc aac gat att ttg act ggt tat tat gct Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Gly Asn Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Ala 115 120 125			384
tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca ggg agt gca tcc gcc Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ala 130 135 140			432
cca acc ctt ttc ccc ctc gtc tcc tgt gag aat tcc ccg tcg gat acg Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn Ser Pro Ser Asp Thr 145 150 155 160			480
agc agc gtg gcc gtt ggc tgc ctc gca cag gac ttc ctt ccc gac tcc Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp Phe Leu Pro Asp Ser 165 170 175			528
atc act ttc tcc tgg aaa tac aag aac aac tct gac atc agc agc acc Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser Asp Ile Ser Ser Thr 180 185 190			576
cgg ggc ttc cca tca gtc ctg aga ggg ggc aag tac gca gcc acc tca Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys Tyr Ala Ala Thr Ser 195 200 205			624
cag gtg ctg ctg cct tcc aag gac gtc atg cag ggc aca gac gaa cac Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln Gly Thr Asp Glu His 210 215 220			672
gtg gtg tgc aaa gtc cag cac ccc aac ggc aac aaa gaa aag aac gtg Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn Lys Glu Lys Asn Val 225 230 235 240			720
cct ctt cca gtg att gct gag ctg cct ccc aaa gtg agc gtc ttc gtc Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys Val Ser Val Phe Val 245 250 255			768
cca ccc cgc gac ggc ttc ttc ggc aac ccc cgc aag tcc aag ctc atc Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile 260 265 270			816
tgc cag gcc acg ggt ttc agt ccc cgg cag att cag gtg tcc tgg ctg Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile Gln Val Ser Trp Leu 275 280 285			864
cgc gag ggg aag cag gtg ggg tct ggc gtc acc acg gac cag gtg cag Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr Thr Asp Gln Val Gln 290 295 300			912

gct gag gcc aaa gag tct ggg ccc acg acc tac aag gtg acc agc aca Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr Lys Val Thr Ser Thr 305 310 315 320	960
ctg acc atc aaa gag agc gac tgg ctc ggc cag agc atg ttc acc tgc Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Gly Gln Ser Met Phe Thr Cys 325 330 335	1008
cgc gtg gat cac agg ggc ctg acc ttc cag cag aat gcg tcc tcc atg Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met 340 345 350	1056
tgt gtc ccc gat caa gac aca gcc atc cgg gtc ttc gcc atc ccc cca Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro 355 360 365	1104
tcc ttt gcc agc atc ttc ctc acc aag tcc acc aag ttg acc tgc ctg Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu 370 375 380	1152
gtc aca gac ctg acc acc tat gac agc gtg acc atc tcc tgg acc cgc Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg 385 390 395 400	1200
cag aat ggc gaa gct gtg aaa acc cac acc aac atc tcc gag agc cac Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His 405 410 415	1248
ccc aat gcc act ttc agc gcc gtg ggt gag gcc agc atc tgc gag gat Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Cys Glu Asp 420 425 430	1296
gac tgg aat tcc ggg gag agg ttc acg tgc acc gtg acc cac aca gac Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp 435 440 445	1344
ctg ccc tcg cca ctg aag cag acc atc tcc cgg ccc aag ggg gtg gcc Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala 450 455 460	1392
ctg cac agg ccc gat gtc tac ttg ctg cca cca gcc cgg gag cag ctg Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu 465 470 475 480	1440
aac ctg cgg gag tcg gcc acc atc acg tgc ctg gtg acg ggc ttc tct Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe Ser 485 490 495	1488
ccc gcg gac gtc ttc gtg cag tgg atg cag agg ggg cag ccc ttg tcc Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser	1536



500	505	510	
ccg gag aag tat gtg acc agc gcc cca atg cct gag ccc cag gcc cca			1584
Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro			
515	520	525	
ggc cgg tac ttc gcc cac agc atc ctg acc gtg tcc gaa gag gaa tgg			1632
Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp			
530	535	540	
aac acg ggg gag acc tac acc tgc gtg gtg gcc cat gag gcc ctg ccc			1680
Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro			
545	550	555	560
aac agg gtc acc gag agg acc gtg gac aag tcc acc ggt aaa ccc acc			1728
Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys Pro Thr			
565	570	575	
ctg tac aac gtg tcc ctg gtc atg tcc gac aca gct ggc acc tgc tac			1776
Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr			
580	585	590	
tga			1779

<210> 2  
 <211> 592  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2  
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly  
 1 5 10 15  
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
 20 25 30  
 Pro Gly Gly Cys Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
 35 40 45  
 Ser Ser Cys Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60  
 Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala  
 65 70 75 80  
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys Ser Lys Asn  
 85 90 95  
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
 100 105 110  
 Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Gly Asn Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Ala  
 115 120 125  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ala  
 130 135 140  
 Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn Ser Pro Ser Asp Thr

145                      150                      155                      160  
 Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp Phe Leu Pro Asp Ser  
                                  165                      170                      175  
 Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser Asp Ile Ser Ser Thr  
                                  180                      185                      190  
 Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys Tyr Ala Ala Thr Ser  
                                  195                      200                      205  
 Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln Gly Thr Asp Glu His  
                                  210                      215                      220  
 Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn Lys Glu Lys Asn Val  
 225                                   230                                   235                                   240  
 Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys Val Ser Val Phe Val  
                                  245                                   250                                   255  
 Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile  
                                  260                                   265                                   270  
 Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile Gln Val Ser Trp Leu  
                                  275                                   280                                   285  
 Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr Thr Asp Gln Val Gln  
                                  290                                   295                                   300  
 Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr Lys Val Thr Ser Thr  
 305                                   310                                   315                                   320  
 Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Gly Gln Ser Met Phe Thr Cys  
                                  325                                   330                                   335  
 Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met  
                                  340                                   345                                   350  
 Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro  
                                  355                                   360                                   365  
 Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu  
                                  370                                   375                                   380  
 Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg  
 385                                   390                                   395                                   400  
 Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His  
                                  405                                   410                                   415  
 Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Cys Glu Asp  
                                  420                                   425                                   430  
 Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp  
                                  435                                   440                                   445  
 Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala  
                                  450                                   455                                   460  
 Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu  
 465                                   470                                   475                                   480  
 Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe Ser  
                                  485                                   490                                   495  
 Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser  
                                  500                                   505                                   510  
 Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro  
                                  515                                   520                                   525  
 Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp  
                                  530                                   535                                   540  
 Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro

545		550		555		560
Asn Arg Val Thr	Glu Arg Thr Val	Asp Lys Ser Thr	Gly Lys Pro Thr			
	565	570	575			
Leu Tyr Asn Val	Ser Leu Val Met	Ser Asp Thr Ala	Gly Thr Cys Tyr			
	580	585	590			

<210> 3  
 <211> 723  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(723)  
 <223>

<400> 3  
 atg gtg ttg cag acc cag gtc ttc att tct ctg ttg ctc tgg atc tct 48  
 Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser  
 1 5 10 15

ggt gcc tac ggg gac atc gtg atg acc cag tct cca gac tcc ctg gct 96  
 Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala  
 20 25 30

gtg tct ctg ggc gag agg gcc acc atc aac tgc aag tcc agc cag agt 144  
 Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser  
 35 40 45

gtt tta tac agc tcc aac aat aag aac tac tta gct tgg tac cag cag 192  
 Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln  
 50 55 60

aaa cca gga cag cct cct aag ctg ctc att tac tgg gca tct acc cgg 240  
 Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg  
 65 70 75 80

gaa tcc ggg gtc cct gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat 288  
 Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
 85 90 95

ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag gct gaa gat gtg gca gtt tat 336  
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr  
 100 105 110

tac tgt cag caa tat tat agt act cct ccg acg ttc ggc caa ggg acc 384  
 Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr  
 115 120 125

aag gtg gaa atc aaa cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc 432  
 Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe  
 130 135 140

ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc 480  
 Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys  
 145 150 155 160

ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg 528  
 Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val  
 165 170 175

gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag 576  
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln  
 180 185 190

gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc 624  
 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser  
 195 200 205

aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat 672  
 Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His  
 210 215 220

cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt 720  
 Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230 235 240

tag 723

<210> 4

<211> 240

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser  
 1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala  
 20 25 30

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser  
 35 40 45

Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln  
 50 55 60

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg  
 65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
 85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr

			100					105				110					
Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Ser	Thr	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr		
		115					120					125					
Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe		
	130					135					140						
Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys		
145				150						155					160		
Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val		
			165						170					175			
Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln		
	180						185					190					
Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser		
	195						200				205						
Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His		
	210					215				220							
Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys		
225					230					235					240		

<210> 5  
 <211> 480  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(480)  
 <223>

<400> 5  
 atg aag aac cat ttg ctt ttc tgg gga gtc ctg gcg gtt ttt att aag 48  
 Met Lys Asn His Leu Leu Phe Trp Gly Val Leu Ala Val Phe Ile Lys  
 1 5 10 15

gct gtt cat gtg aaa gcc caa gaa gat gaa agg att gtt ctt gtt gac 96  
 Ala Val His Val Lys Ala Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp  
 20 25 30

aac aaa tgt aag tgt gcc cgg att act tcc agg atc atc cgt tct tcc 144  
 Asn Lys Cys Lys Cys Ala Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser  
 35 40 45

gaa gat cct aat gag gac att gtg gag aga aac atc cga att att gtt 192  
 Glu Asp Pro Asn Glu Asp Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val  
 50 55 60

cct ctg aac aac agg gag aat atc tct gat ccc acc tca cca ttg aga 240  
 Pro Leu Asn Asn Arg Glu Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg  
 65 70 75 80

acc aga ttt gtg tac cat ttg tct gac ctc tgt aaa aaa tgt gat cct 288  
 Thr Arg Phe Val Tyr His Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro  
 85 90 95

aca gaa gtg gag ctg gat aat cag ata gtt act gct acc cag agc aat 336  
 Thr Glu Val Glu Leu Asp Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn  
 100 105 110

atc tgt gat gaa gac agt gct aca gag acc tgc tac act tat gac aga 384  
 Ile Cys Asp Glu Asp Ser Ala Thr Glu Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg  
 115 120 125

aac aag tgc tac aca gct gtg gtc cca ctc gta tat ggt ggt gag acc 432  
 Asn Lys Cys Tyr Thr Ala Val Val Pro Leu Val Tyr Gly Gly Glu Thr  
 130 135 140

aaa atg gtg gaa aca gcc tta acc cca gat gcc tgc tat cct gac taa 480  
 Lys Met Val Glu Thr Ala Leu Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp  
 145 150 155

<210> 6  
 <211> 159  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 6  
 Met Lys Asn His Leu Leu Phe Trp Gly Val Leu Ala Val Phe Ile Lys  
 1 5 10 15  
 Ala Val His Val Lys Ala Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp  
 20 25 30  
 Asn Lys Cys Lys Cys Ala Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser  
 35 40 45  
 Glu Asp Pro Asn Glu Asp Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val  
 50 55 60  
 Pro Leu Asn Asn Arg Glu Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg  
 65 70 75 80  
 Thr Arg Phe Val Tyr His Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro  
 85 90 95  
 Thr Glu Val Glu Leu Asp Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn  
 100 105 110  
 Ile Cys Asp Glu Asp Ser Ala Thr Glu Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg  
 115 120 125  
 Asn Lys Cys Tyr Thr Ala Val Val Pro Leu Val Tyr Gly Gly Glu Thr  
 130 135 140  
 Lys Met Val Glu Thr Ala Leu Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp  
 145 150 155

<210> 7

<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 7  
ccaacggcaa caaagaaaag aacg 24

<210> 8  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 8  
aacatgctct ggccgagcca gtcg 24

<210> 9  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 9  
gcaagtcag ccagagtgtt ttat 24

<210> 10  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 10  
ctgtccttgc tgtcctgctc tgtg 24

<210> 11  
<211> 33  
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 11

aacagctcga gccaccatgg agtttgggct gag

33

<210> 12

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 12

agcggccagc cgccccgagc ctgtcgacag gc

32

<210> 13

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 13

atagaattcc accatggtgt tgcagaccca gg

32

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 14

ggagcaggcg gccgcacttc tccctctaac

30

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an artificially synthesized sequence

&lt;400&gt; 15

accattgaga accagatttg tgta

24

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an artificially synthesized sequence

&lt;400&gt; 16

tgtgtagcac ttgtttctgt cata

24

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 17

atgaattcca ccatgaagaa ccatttgc

28

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an artificially synthesized primer sequence

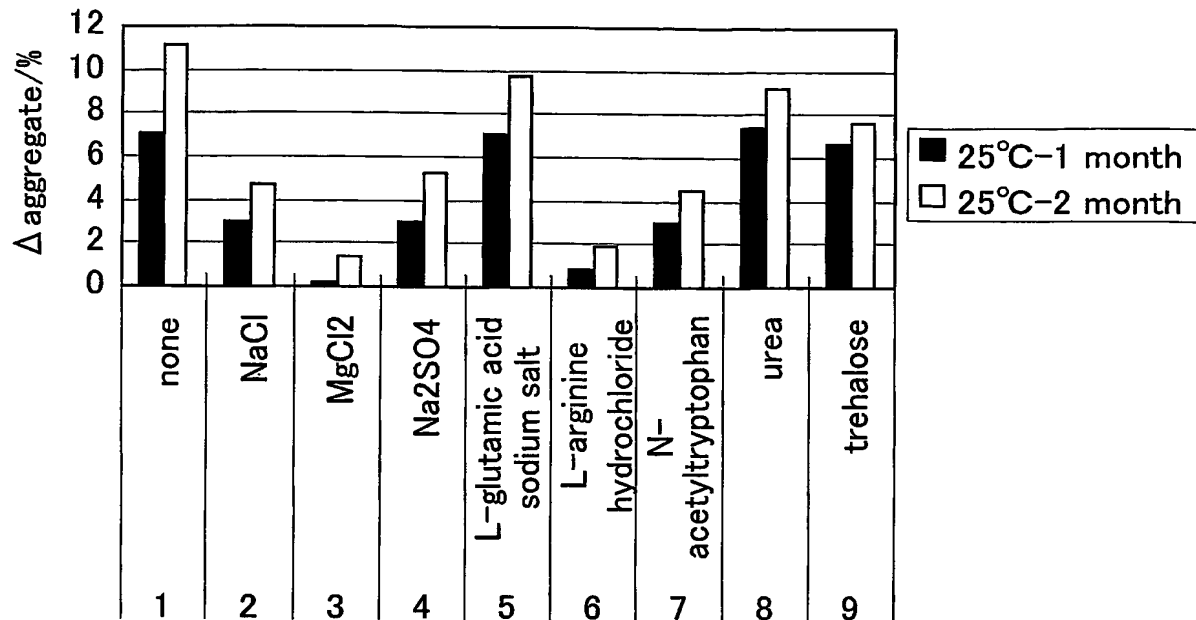
&lt;400&gt; 18

tatctagatt agtcaggata gcaggc

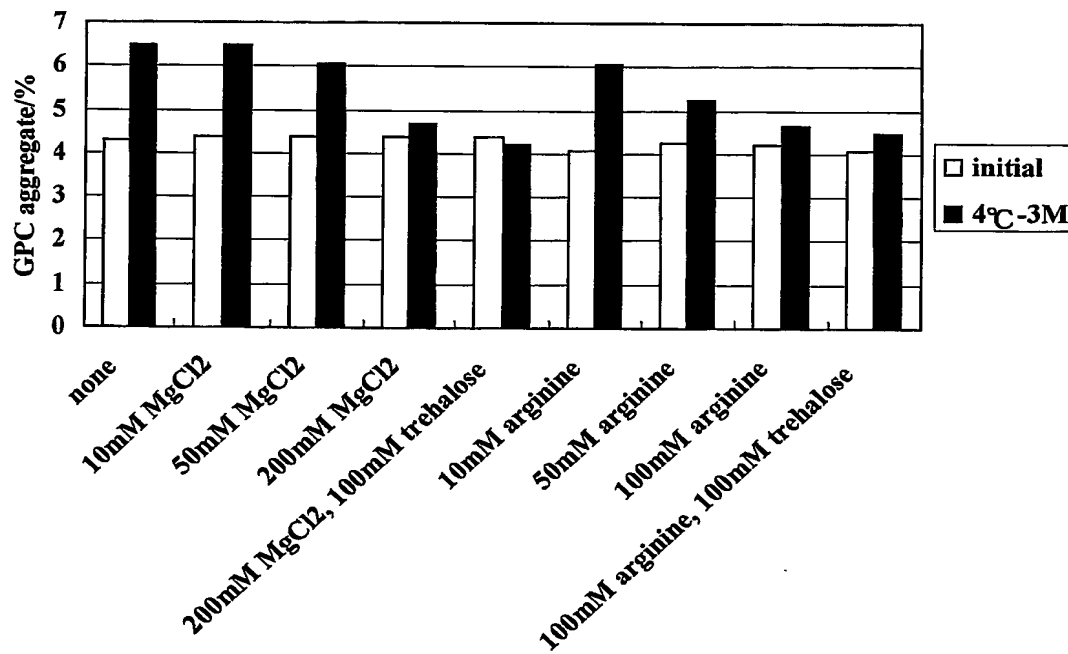
26

【書類名】 図面

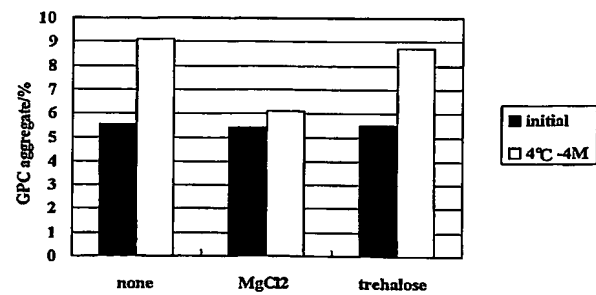
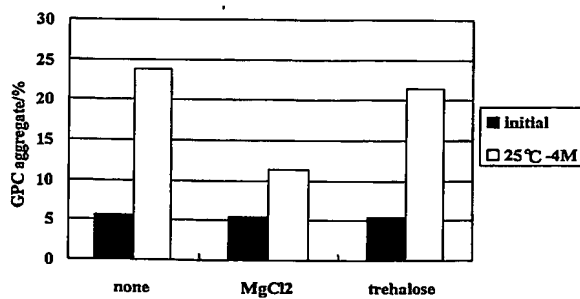
【図 1】



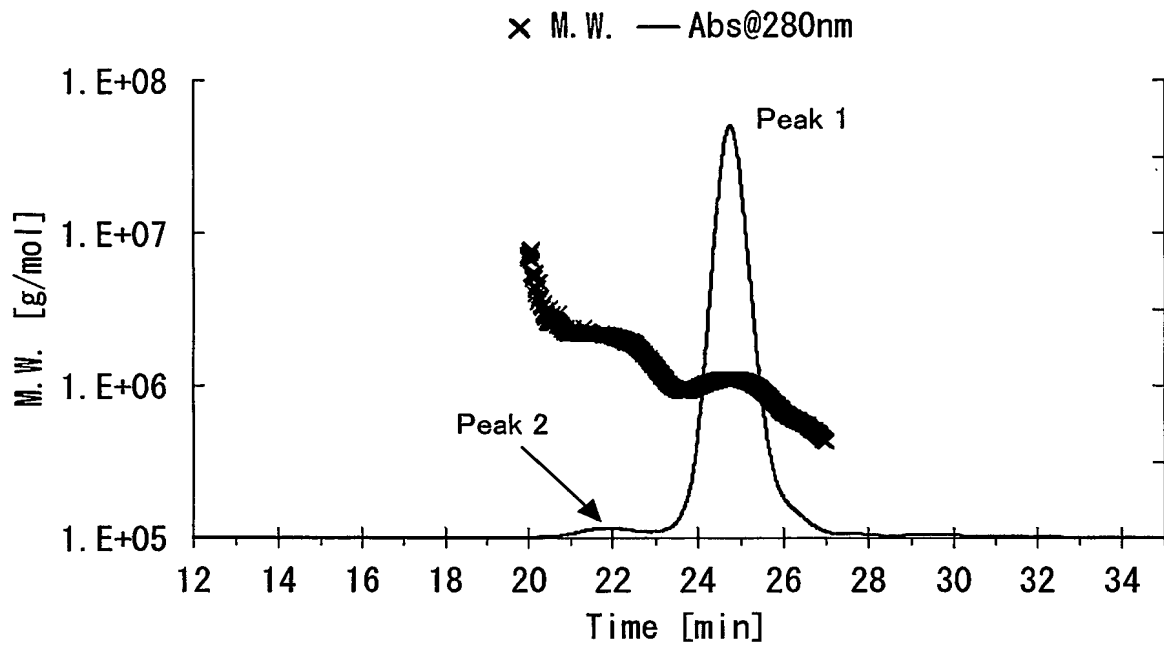
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 高濃度のIgMを溶液中にて安定化させることを課題とする。

【解決手段】 塩化マグネシウムや塩酸アルギニン等の多価カチオン性のイオンを含む化合物を添加物として用いることによって、溶液におけるIgMの会合化を抑制し、IgMの安定な高濃度溶液を調製しうることを見出した。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 3 5 1 3 8 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 3 3 1 1 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 9 月 5 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号

氏 名

中外製薬株式会社